

GRID – Giessen Research Center in Infectious Diseases

Krankheitsbekämpfung durch Genomforschung – Untersuchung des molekularen Dialogs von Bakterium und Wirt bei Sepsis

Von Susanne Schuler-Lüttmann,
Philippos Pashalidis und
Trinad Chakraborty



Auch im Zeitalter der Antibiotika weist die Sepsis als schwere Allgemeininfektion noch eine hohe Sterblichkeit auf. In Deutschland wird jährlich bei rund 1% aller Krankenhauspatienten – das entspricht mehreren Hunderttausend Patientinnen und Patienten – ein septischer Schock diagnostiziert; die Letalität dieses schweren Krankheitsbildes liegt bei 30 bis 40%. Weltweit sind Sepsis, septisches Organversagen und septischer Schock die Haupttodesursache in der Intensivmedizin. Am Gießener Universitätsklinikum erforschen zahlreiche Wissenschaftler seit langem die molekularen Veränderungen bei Sepsis. Im Rahmen des nun vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten GRID-Projekts wird der molekulare Dialog von Bakterium und Wirt bei Sepsis mit Hilfe hochmoderner Verfahren wie der Chip-Technologie untersucht. Ziel des GRID-Projekts ist die Entwicklung neuer Therapieansätze bei der Behandlung des lebensbedrohlichen Krankheitsbildes Sepsis.

Die Sepsis als eigenständiges Krankheitsbild wird sowohl in der einschlägigen Literatur als auch in der Klinik teilweise unterschiedlich definiert. Bereits 1914 wurde von Schottmüller [1] eine infektiologische Sepsisdefinition gegeben, die besagt: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ Im Rahmen der Consensus Conference (ACCP/CCM) [2], wurden 1991 die Begriffe Infektion, Bakteriämie, SIRS (systemic inflammatory response syndrome), Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock, Hypotension und MODS (multiple organ dysfunction syndrome) neu definiert.

Während früher die Symptome bei Sepsis als Zeichen eines direkten „toxischen“ Effekts des mikrobiologischen Agens auf die Wirtszelle gewertet wurden, wissen die Ärzte und Forscher seit ungefähr einem Jahrzehnt, dass der Wirt sich selbst durch eine Überreaktion bei der Entzündungsantwort schadet: Die übermäßige Aktivierung des Immunsystems führt zu einer

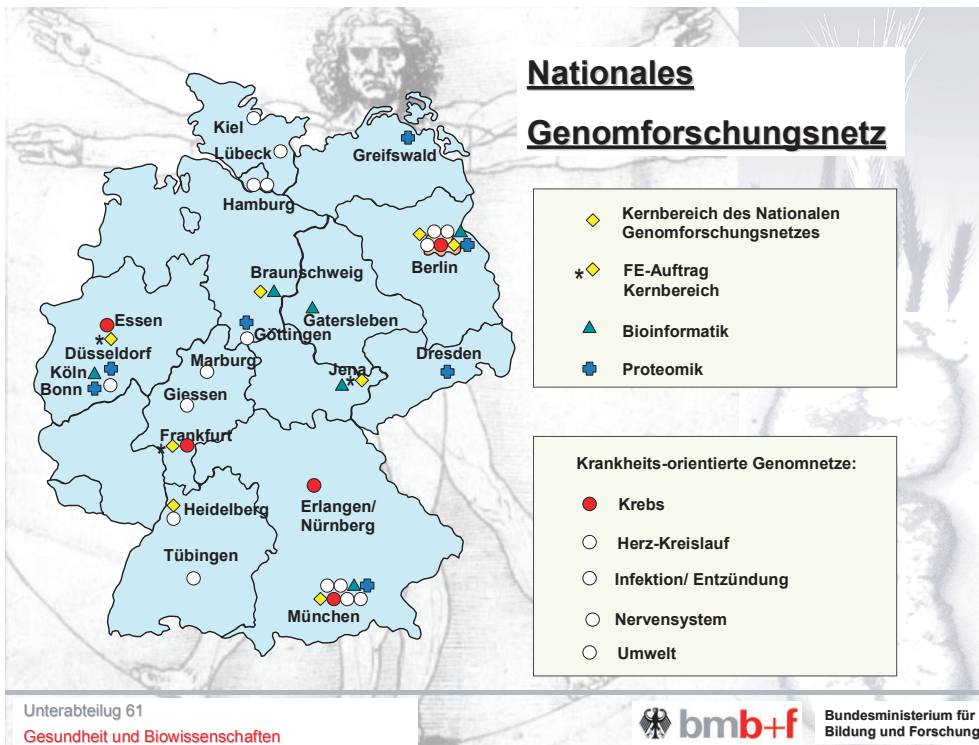


Abb. 2: Struktur des Nationalen Genomforschungsnetzes mit Kernbereichen und Krankheits-orientierten Genomnetzen.

geschlossen haben (Abb. 2). Fünf Krankheitsbereiche, die viele Menschen betreffen, sollen erforscht werden: Herz-Kreislauf, Krebs, Erkrankungen des Nervensystems, umweltbedingte Erkrankungen, Infektionen und Entzündungen.

Insgesamt stehen für die Genomforschung in den nächsten drei Jahren 350 Millionen Mark zur Verfügung; die Gelder stammen aus den UMTS-Zinserlösen (Universal Mobile Telecommunications Sys-

- Anzeige -

Freisetzung zahlreicher Mediatoren (Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin- 1β ,...) und induziert damit eine systemische Entzündungsreaktion. Aufgrund dieser Reaktion kommt es zu schweren Störungen der Makro- und Mikrozirkulation und damit der Durchblutung der Organe.

Der Krankheitsverlauf bei Sepsis lässt sich aber nicht einzig und allein durch eine übersteigerte Entzündungsantwort erklären. So gibt es Studien, die zeigen, dass es nach der initialen Überaktivierung des Immunsystems zu einer kompensatorischen anti-entzündlichen Antwort kommt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die molekularen Veränderungen und der Zeitablauf dieser Reaktionen im Dialog von bakterieller Infektion und Entzündungs- bzw. Immunantwort des Patienten komplex und bislang nur unzureichend verstanden sind.

Am Gießener Universitätsklinikum beschäftigen sich zahlreiche Ärzte und Forscher seit langem intensiv mit schweren bakteriellen Infektionen. Dieses Forschungsinteresse spiegelt sich auch in Sonderforschungsbereichen, DFG-Programmen und in der Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Multizenterstudien mit diesem Fokus wider.

Nationales Genomforschungsnetz

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (bmb + f) fördert mit dem Programm „Krankheitsbekämpfung durch Genomforschung“ qualifizierte Forschungszentren, die sich in Netzwerken zusammenge-

tems). Mit 133 Millionen Mark wird der Kernbereich aus den bestehenden fünf Kompetenzzentren gefördert. Das sind das Deutsche Krebsforschungszentrum Heidelberg, die Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig, das Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München, das Max-Delbrück-Centrum in Berlin und das Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin. 132 Millionen Mark fließen in die krankheitsorientierten Genomnetze, an diesen sind insgesamt 16 Universitäten beteiligt. Darüber hinaus werden ethische, soziale und rechtliche Fragestellungen in das Genomfor-

schungsnetz integriert und mit 20 Millionen Mark gefördert. 65 Millionen Mark werden für die Plattformtechnologien, Proteomforschung und Bioinformatik ausgegeben.

Das hier beschriebene GRID-Projekt wird mit sechs Millionen DM gefördert. Insgesamt werden so am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen 19 Stellen für Wissenschaftler, Doktoranden und technische Assistenten neu geschaffen.

GRID-Projekt

Das „Nationale Genomforschungsnetz“ ist so konzipiert, dass die kli-

nischen Ergebnisse unmittelbar in die funktionelle Genomforschung einfließen und verarbeitet werden können und umgekehrt. Um alle relevanten Informationen bei der Behandlung lebensbedrohlicher bakterieller Infektionen zu erfassen, arbeiten folgende Zentren des Universitätsklinikums interdisziplinär zusammen: Institut für Medizinische Mikrobiologie (Koordinator des Gesamtprojekts: Prof. Trinad Chakraborty); Zentrum für Innere Medizin (Prof. Werner Seeger; Prof. Friedrich Grimminger); Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (Prof. Ludwig Gortner); Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie (Prof. Helmut

- Anzeige -

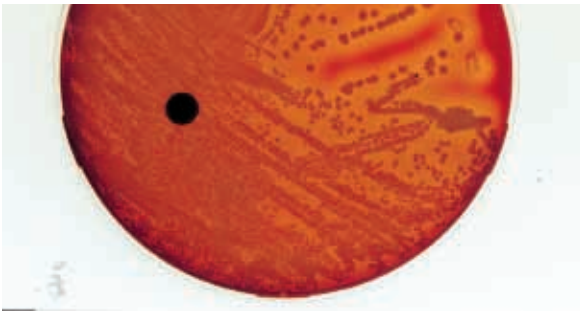


Abb. 3: Wachstum von *Staph. aureus* auf einer Blutagar-Platte

Grimm); Klinik für Unfallchirurgie (Prof. Reinhard Schnettler); Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin (Prof. Gunter Hempelmann); Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin (Prof. Gregor Bein) und Institut für Klinische und Administrative Datenverarbeitung (Prof. Kurt Marquardt).

Innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzwerkes ist das Gießener Projekt mit vier weiteren Genomnetzen für Infektion/Entzündung in Tübingen, München, Berlin und Hamburg sowie mit dem Kernbereich in Braunschweig (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung) verknüpft.

Die Forschungstätigkeit innerhalb dieses leistungsfähigen nationalen Forschungsnetzes soll dazu beitragen, dass Deutschland auch im internationalen Wettbewerb, insbesondere gegenüber den USA, Japan und Großbritannien, konkurrenzfähig bleibt.

Erreger und Wirtszellen im Fokus

Die grampositiven Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Listeria monocytogenes* sind wichtige Erreger von Sepsis und septischem Schock. *Staphylococcus aureus* (Abb.3) ist der am meisten verbreitete Krankenhauskeim. Sorge bereitet den Ärzten vor allem die zunehmende Resistenz dieses Keims gegenüber gängigen Antibiotika. Insbesondere auf Intensivstationen finden sich zunehmend multiresistente Stämme (MRSA). *Streptococcus pneumoniae* ist bei Kindern die Hauptursache für Meningitis. Auch bei diesem Keim sind sehr schnell antibiotikaresistente

JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Frankfurter Straße 107
35390 Gießen
Tel.: 0641 / 99-41250
Fax: 0641 / 99-41259
e-mail: trinad.chakraborty@mikrobio.med.uni-
giessen.de



Susanne Schuler-Lüttmann studierte von 1988 bis 1995 Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, wo sie 1995 am Institut für Klinische Chemie promoviert wurde. Ihre Doktorarbeit wurde vom Herzzentrum Münster als beste Arbeit auf dem Gebiet der Herz-Kreislaufkrankungen des Jahres 1995 ausgezeichnet. Seit April 2001 ist sie als wissenschaftliche Angestellte am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen tätig. Neben dem Abschluss ihrer Weiterbildung zur Fachärztin für Laboratoriumsmedizin engagiert sich Dr. Schuler-Lüttmann in der Forschungsgruppe des GRID-Projektes.

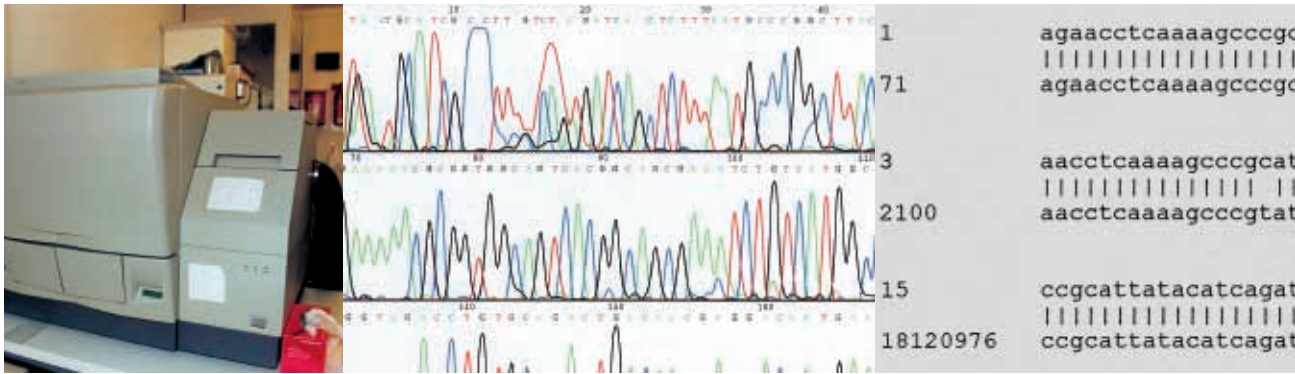


Abb. 4: Automatisierte Sequenzierung mit einem Kapillar-Sequenziergerät und Darstellung der generierten Daten im Ausdruck oder als Datei (Datenbank-Suche)

Stämme aufgetreten, die erhebliche Probleme bei der Therapie bereiten können. *Listeria monocytogenes* ist nach wie vor eine gefürchtete Ursache von Sepsis beim Ungeborenen bzw. Neugeborenen sowie bei älteren immundefizienten Patienten.

Um die Reaktion des Wirts auf die bakterielle Infektion zu unter-

suchen, werden zunächst verschiedene Zellkulturmodelle benutzt. In diesen Modellen werden menschliche oder tierische Zellen, die zuvor aus Blut (Granulocyten, Monocyten), aus Lungengewebe (Bronchialepithelien, Alveolarepithelien) oder aus Nierengewebe (Tubuluszellen) gewonnen wurden, mit den

entsprechenden Bakterien *in vitro* infiziert und damit die Infektion beim Patienten simuliert. Um diese experimentellen Verhältnisse noch weiter in Einklang mit dem Verlauf der Sepsis bei einem Patienten zu bringen, wird in einem nächsten Schritt mit *ex vivo*-Organmodellen von Ratten bzw. Mäusen gearbeitet. Anschließend werden Tierversuche durchgeführt, um die gefundenen Ergebnisse im ganzen Organismus zu untersuchen. Parallel zur Auswertung und Interpretation dieser Modellversuche werden von Patienten, bei denen die Gefahr einer Sepsis besteht (zum Beispiel Patienten mit schwerem Polytrauma, schwerer Lungenentzündung, etc.), klinische Proben gewonnen und asserviert (Blut, Biopsien, etc.).

Molekulargenetische Prinzipien und Technologien

Seit der Veröffentlichung der Sequenz des menschlichen Genoms vor einem halben Jahr und der genomischen Sequenzierung vieler humanpathogener Bakterien (u.a. auch für *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Listeria monocytogenes* [3-5]) bietet sich den Wissenschaftlern erstmals die Möglichkeit, den molekularen Dialog von Bakterium und Wirt mit Hilfe hochmoderner molekularbiologischer Verfahren zu untersuchen.

Am Anfang molekulargenetischer Untersuchungen steht in der Regel die Isolierung der Erbsubstanz, der

Desoxyribonukleinsäure (DNA) bzw. der Ribonukleinsäure (RNA), aus Proben wie Blut, Zellen, Gewebe oder auch Bakterien. Da die Suche nach den relevanten Genen mit der sprichwörtlichen Suche nach einer Nadel im Heuhaufen vergleichbar ist, müssen die entsprechenden Bestandteile der DNA vervielfacht werden; dies geschieht durch die sog. Polymerasekettenreaktion (PCR). Für die Entschlüsselung des genetischen Codes (= Sequenzierung) stehen Sequenziergeräte zur Verfügung. Bei der Sequenzierung wird der genetische Code ermittelt, indem die Abfolge der vier verschiedenen Basen (A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin, T = Thymin) in einem DNA-Molekül analysiert wird (Abb. 4). Mit Hilfe der Genomsequenzierung können so zum Beispiel Gene, die bei Sepsis beteiligt sind, genauer charakterisiert werden. Die Abfolge der einzelnen Moleküle kann mit anderen bereits bekannten Sequenzen mittels medizin- und bioinformatischer Methoden verglichen werden und damit Aufschluss über deren genauere Funktion geben.

So war das Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Gießen maßgeblich an der Sequenzierung des Genoms von *Listeria monocytogenes* im Rahmen eines EU-Netzwerkes beteiligt.

Darüber hinaus besteht die technische Möglichkeit, punktuelle, aber wichtige Unterschiede in der Erbsubstanz, sogenannte single nucleotide polymorphisms (SNPs), zu detektieren. Die DNA aller Menschen unterscheidet sich in ungefähr 0,1 % der gesamten Sequenz durch einzelne Nukleotidaustausche. Relativ gesehen ist das eine kleine Zahl, absolut stehen dahinter bei der Größe des Humangenoms drei Millionen Varianten. Die meisten dieser Varianten haben keine krankhafte Bedeutung, da sie in Bereichen außerhalb der Gene oder außerhalb der für die Gene wichtigen Bereiche liegen. Einigen jedoch kommt eine große Bedeutung

- Anzeige -

zu. Sie werden zum Beispiel für die unterschiedliche Wirksamkeit eines Medikamentenwirkstoffes bei verschiedenen Menschen verantwortlich gemacht. Andere SNPs dienen als Marker für das Risiko eines Menschen, an einer bestimmten Krankheit zu erkranken. Die Untersuchung dieser SNPs wird zukünftig eine wichtige Rolle in der Entwicklung von neuen Prognosemarkern und Therapeutika spielen. (Abb.5, entnommen und adaptiert aus [6]).

Im Mittelpunkt des GRID-Projektes steht die Untersuchung der Expression (= Aktivität) virulenz-assoziiierter Bakteriengene auf einen Zusammenhang mit spezifischen Antwortmechanismen des Wirts (Verteidigungsstrategien und Entzündungsprozesse) und umgekehrt die Untersuchung der Expression von Wirtszellgenen auf einen Zusammenhang mit spezifischen Virulenz-

faktoren von Bakterien. (Abb. 6, entnommen und adaptiert aus [7]).

Zu diesem Zweck wird die Ribonukleinsäure (RNA) aus Bakterien (a), aus Zellen, die in der Zellkultur unter optimalen Bedingungen wachsen (Abb. 4b), und aus Wirtszellen, die zuvor mit Bakterien infiziert wurden (c), isoliert. Die isolierte RNA wird revers umgeschrieben in die korrespondierende DNA (cDNA) und mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert (rot = Cy5; grün = Cy3). Diese Proben werden dann auf einen Gen-Chip gebracht, wo sie mit entsprechenden bakteriellen Gensonden (d) bzw. Wirtsgensonden (e) Verbindungen eingehen (= hybridisieren).

Die Auswertung der Genchips sieht vereinfacht folgendermaßen aus: gelber Spot (= Punkt): keine Veränderung in der Genexpression; roter spot: Aktivierung des entsprechenden Gens; grüner spot: Inakti-

vierung des Gens.

Neben den hier beschriebenen in-vitro-Zellkulturmodellen werden im weiteren Verlauf des GRID-Projektes ex-vivo-Organmodelle, in-vivo-Tierinfektionsmodelle und schließlich klinische Proben von Patienten (Blut, Gewebeproben, etc.) untersucht.

Ziele der GRID-Studie

Die molekulargenetische Methode der Microarrays bietet erstmals die Möglichkeit, unverfälscht die Veränderungen mehrerer Tausend Gene gleichzeitig auf Transkriptionsebene zu untersuchen. Das Mutationsscreening von Genen bzw. funktionellen Genclustern, die während der Sepsis aktiviert bzw. inaktiviert werden, wird zur Identifizierung von Kandidatengen führen. Die Kenntnis dieser Kandi-



Trinad Chakraborty, Jahrgang 1951, Studium der Biochemie in London, Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, auf dem Gebiet der bakteriellen DNA-Replikation; zwei Jahre Postdoktorand am damaligen Bundesgesundheitsamt in Berlin; anschließend am Institut für Mikrobiologie der Universität Würzburg tätig, wo er sich 1990 habilitierte. Im Anschluss folgte ein Aufenthalt als Heisenberg-Stipendiat bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig. 1992 Berufung als Leiter der Infektionsimmunologie an die Justus-Liebig-Universität Gießen; seit 1998 Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen.

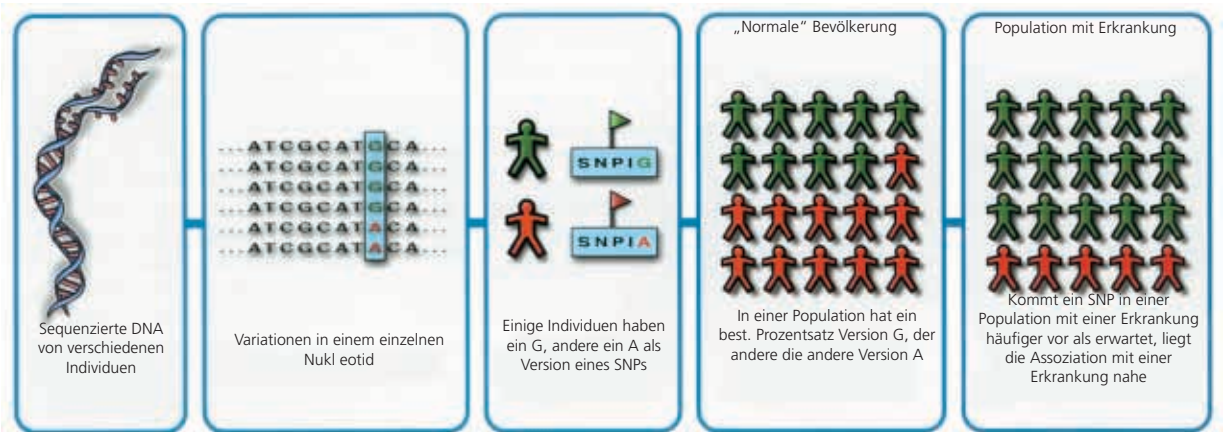


Abb.5 Identifizierung von single nucleotide polymorphisms (SNPs) und ihre Rolle bei der Identifizierung von Risikopatienten

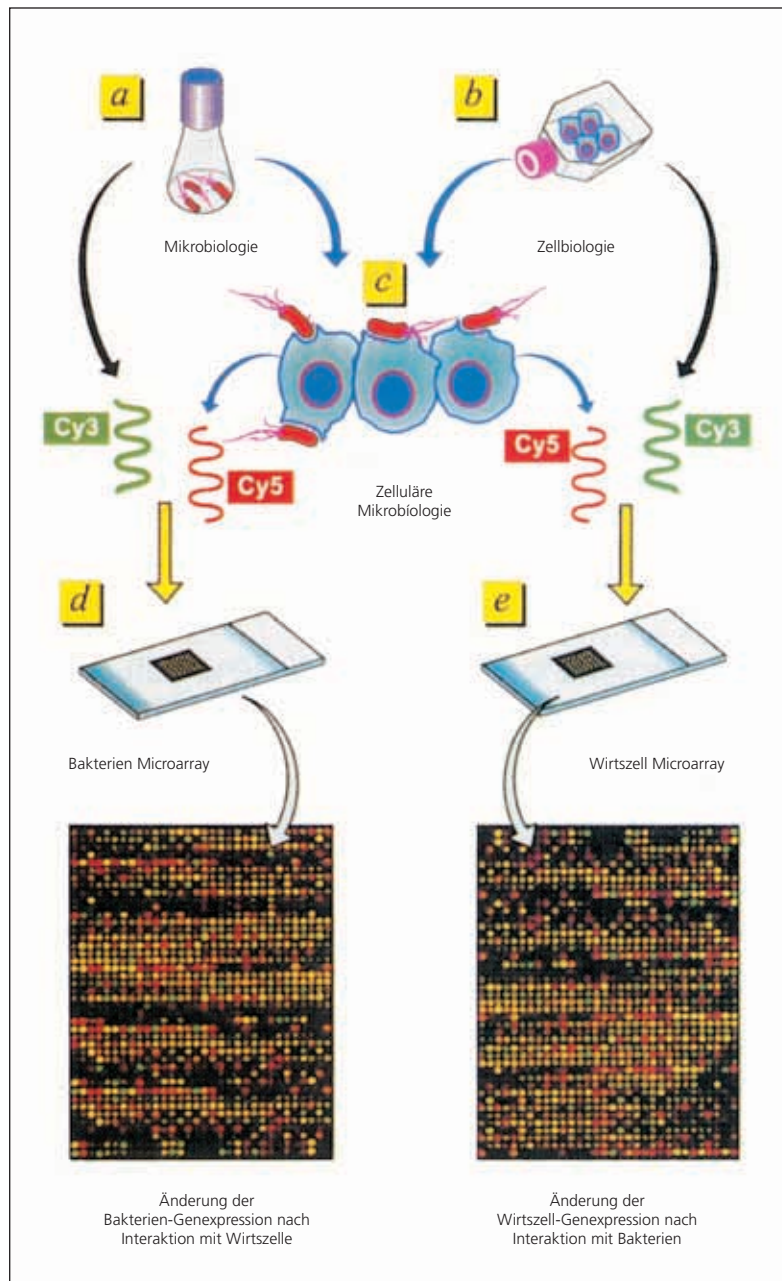


Abb. 6: Einsatz von Microarrays für die Analyse von Bakterium-Wirt-Interaktionen

LITERATUR

- [1] Schottmüller H: Wesen und Behandlung der Sepsis. *InnMed* 1914, 31: 257
- [2] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, et al: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992, 20: 864.
- [3] Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG: Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000, 38:1008-1015.
- [4] Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, et al: Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. 2001, 293:498-506.
- [5] Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, et al: Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 2001, 294: 849-852.
- [6] The Wellcome Trust: Wellcome News suppl. 4, 2001.
- [7] Rappuoli R: Pushing the limits of cellular microbiology: Microarrays to study bacteria-host cell intimate contacts. *PNAS* 2000, 97: 13467-13469.



Philipp Pashalidis studierte von 1993-2000 Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Im Rahmen seiner Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie beschäftigte er sich unter der Leitung von Prof. Chakraborty mit molekular- und zellbiologischen Untersuchungen des Invasionsmechanismus von *Listeria monocytogenes* in eukaryontischen Zellkulturen. Seit Mai 2001 ist er als Arzt im Praktikum am Institut für Medizinische Mikrobiologie tätig.

datengene kann dann zur Erkennung von Hochrisikopatienten beitragen, so dass diese bereits vor Eintreten einer Sepsis prophylaktisch behandelt werden können.

Um zu diesem Ziel zu gelangen, muss eine unvorstellbar große Datenmenge zusammengeführt werden: So werden die Patientendaten (klinische Parameter, Laborbefunde, etc.) mit den Ergebnissen aus den Experimenten (SNPs, Microarrays, Sequenzierung, etc.) zusammengeführt und korreliert. Neben entsprechenden Computern braucht man für diese Aufgabe Medizin- und Bioinformatiker, die speziell für die Generierung, statistische Analyse und Auswertung von Daten aus dem medizinisch-biologischen Bereich ausgebildet sind.

Zusammenfassend basiert das GRID-Projekt auf der interdisziplinären Zusammenarbeit von Ärzten verschiedener Fachrichtungen, Genforschern und Bioinformatikern. Die Verknüpfung von Klinik und Forschung innerhalb des Universitätsklinikums Gießen auf der einen Seite und die Zusammenarbeit mit Forschungszentren innerhalb des nationalen Genomforschungsnetzes auf der anderen Seite schafft ein leistungsfähiges Forschungsnetzwerk.

Die Untersuchung des molekularen Dialogs von Bakterium und Wirt bei Sepsis wird dazu beitragen, dass künftig neue Strategien für die Behandlung dieses schweren Krankheitsbildes entwickelt werden. Die neuen Therapieansät-

ze zielen dabei sowohl auf die frühe und damit rechtzeitige Erkennung von Risikopatienten als auch auf die effektivere Behandlung bereits erkrankter Patienten, sei es in Form von pharmakologischer Therapie oder transienter Gentherapie. •

- Anzeige -